

13  
DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION

1<sup>re</sup> PUBLICATION

- 22 Date de dépôt ..... 15 octobre 1971, à 16 h 33 mn.  
41 Date de la mise à la disposition du  
public de la demande..... B.O.P.I. — «Listes» n. 22 du 2-6-1972.
- 51 Classification internationale (Int. Cl.) A 61 k 27/00.
- 71 Déposant : Société dite : RICHARDSON-MERRELL S.P.A., résidant en Italie.

Titulaire : *Idem* 71

- 74 Mandataire : Cabinet Beau de Loménie, Ingénieurs-Conseils, 55, rue d'Amsterdam, Paris (8).
- 54 Composition pour le traitement des affections hépatiques et du surmenage intellectuel.

72 Invention de :

- 33 32 31 Priorité conventionnelle : *Demande de brevet déposée aux États-Unis d'Amérique le  
15 octobre 1970, n. 80.936 aux noms de Procolo Causa et Giulio Cesare Perri.*

La présente invention concerne une composition d'acides aminés destinée au traitement des affections hépatiques et du surmenage intellectuel.

L'association d'une ammoniémie élevée et des encéphalopathies hépatiques ainsi que les effets toxiques possibles de l'ammoniaque dans d'autres maladies sont bien connus. Lorsqu'on ingère des sels d'ammonium ou une alimentation riche en protéines, la quantité d'ammoniaque introduite dans la circulation porte augmente. Des hémorragies importantes du tractus gastro-intestinal peuvent avoir le même résultat. En cas de mauvais fonctionnement hépatique et/ou de communications collatérales entre la veine porte et les veines de la circulation générale si courantes dans les cirrhoses, la concentration élevée de l'ammoniaque, présente dans le sang portal, évite la barrière hépatique, et la teneur en ammoniaque du sang périphérique peut alors atteindre des valeurs toxiques. Les efforts visant à réduire l'ammoniémie sont donc très importants.

On sait, à ce jour, qu'un acide aminé, la L-arginine, est utile pour abaisser l'ammoniémie. Il semble que cette propriété qu'a l'arginine de réduire l'ammoniémie soit due à son rôle de précurseur de l'ornithine dans le cycle de l'uréogénèse de Krebs et Henseleit. L'arginine est transformée dans le foie sous l'effet de l'arginase en ornithine et urée. Le cycle d'uréogénèse comporte essentiellement 3 acides aminés à savoir l'arginine, l'ornithine et la citrulline. On a également indiqué que la L-ornithine abaisse l'ammoniémie lorsqu'on l'injecte de façon massive par voie veineuse en des quantités trois à quatre fois supérieures à la quantité nécessaire d'arginine. On a également signalé que la L-citrulline possède une action bénéfique, bien qu'à un degré moindre.

La demanderesse a découvert qu'on peut traiter des malades ayant une ammoniémie élevée par un mélange de L-arginine et de L-ornithine, dans un rapport pondéral de trois parties de L-arginine pour une à deux parties de L-ornithine, dont l'action est synergique et qu'on obtient de meilleurs résultats qu'en utilisant la L-arginine, la L-ornithine ou la L-citrulline séparément ou un mélange de ces trois acides aminés. En pratique, grâce au mélange synergique de l'invention, il suffit d'administrer des doses d'acides aminés bien inférieures et on obtient de meilleurs résultats qu'avec un mélange quelconque de ces trois acides aminés ou avec un acide aminé seul. On peut utiliser le mélange synergique d'acides aminés de l'invention pour le traitement de l'insuffisance hépatique, du coma hépatique,

des hépatites aiguës et chroniques, seul ou en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques. De plus, on peut utiliser ce mélange synergique pour traiter le surmenage intellectuel, la débilité et l'asthénie physique et psychique. Le mélange synergique d'acides aminés de l'invention est même plus actif que l'acétylglutamine.

Les compositions selon l'invention sont constituées d'un mélange de trois parties en poids de L-arginine ou d'un de ses sels convenant en pharmacie résultant de l'addition d'acides organiques ou minéraux non toxiques et d'une à deux parties en poids de L-ornithine ou d'un de ses sels convenant en pharmacie résultant de l'addition d'acides minéraux ou organiques non toxiques. On utilise cette composition pour traiter les affections hépatiques associées à une ammoniémie élevée et également pour traiter le surmenage intellectuel. Un mélange préférentiel de L-arginine et de L-ornithine est constitué de 0,607 millimole de L-arginine et de 0,169 millimole de L-ornithine bien qu'on puisse utiliser d'autres mélanges correspondants à la gamme de rapports précédemment citée.

Bien qu'on puisse utiliser le mélange synergique d'acides aminés de l'invention seul dans un support stérile convenant en pharmacie tel que l'eau ou une solution saline isotonique, il est également souhaitable de combiner le mélange synergique d'acides aminés avec d'autres agents thérapeutiques tels que par exemple la méthionine, l'acide lipofique, la cocarboxylase, la coenzyme B<sub>12</sub>, la coenzyme A, l'extrait de foie et l'oxybétaine.

Comme exemples d'acides non toxiques qu'on peut utiliser pour former les sels convenant en pharmacie résultant de l'addition d'un acide à la L-arginine et à la L-ornithine utilisables dans les mélanges synergiques de l'invention, on peut citer des acides minéraux tels que les acides chlorhydrique, bromhydrique, sulfurique ou phosphorique et similaires, et des acides organiques carboxyliques tels que les acides acétique, propionique, glycolique, lactique, pyruvique, malonique, succinique, fumarique, malique, tartrique, citrique, ascorbique, maléique, benzoïque, phénylacétique, cinnamique, salicylique et similaires.

On peut administrer le mélange de l'invention à un hôte nécessitant un traitement contre des affections hépatiques ou le surmenage intellectuel par voies orale, intraveineuse ou intramusculaire. On obtient généralement de bons résultats lorsqu'on administre les mélanges aux mammifères à des doses quotidiennes comprises entre environ 7 mg à environ 70 mg par kilogramme de poids corporel, réparties de préférence en deux à quatre doses journalières. La dose journalière totale est généralement comprise entre environ 500 mg et environ 12 g.

Le mélange de l'invention favorise la synthèse de l'urée à partir de l'ammoniaque dans le foie de l'hôte auquel on l'administre et abaisse ainsi son ammoniémie.

Les formulations suivantes constituent des exemples de de  
5 formulations administrables.

Administration orale

(A) Comprimés réalisés selon les techniques de fabrication classiques à partir de :

	Chlorhydrate de L-arginine	300 mg
10	Chlorhydrate de L-ornithine	200 mg

(B) Comprimés ou capsules façonnés selon les techniques classiques à partir de :

	Phosphate monohydraté de L-arginine	125 mg
	Phosphate monohydraté de L-ornithine	85 mg
15	Acide lipoïque	50 mg
	Oxybétaine	250 mg
	Coenzyme B <sub>12</sub>	1 mg

Administration intramusculaire

	Solutions de	
20	(A)	Chlorhydrate de L-arginine 300 mg
		Chlorhydrate de L-ornithine 200 mg
		Eau q.s. pour 3 ml
	(B)	Chlorhydrate de L-arginine 300 mg
		Chlorhydrate de L-ornithine 200 mg
25		Coccarboxylase 50 mg
		Coenzyme A 1 mg
		Coenzyme B <sub>12</sub> 1 mg
		Extrait de foie q.s. pour 3 ml
	(C)	Phosphate monohydraté de L-arginine 375 mg
30		Phosphate monohydraté de L-ornithine 255 mg
		Extrait de foie q.s. pour 3 ml

Administration par phléboclyse et hypodermoclyse

	(A)	Chlorhydrate de L-arginine 3 g
		Chlorhydrate de L-ornithine 2 g
35		Solution de chlorure de sodium à 0,6% q.s. pour 100 ml

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention seront mieux compris à la lecture de la description qui va suivre de plusieurs exemples de réalisation en se référant aux dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 représente un graphique des isoboles, les doses en mg/kg de l'un des composants étant représentées en ordonnées et celles de l'autre composant en abscisses;

5 - la figure 2 représente les isoboles de protection contre la mortalité provoquée chez la souris par le chlorure d'ammonium correspondant à des mélanges de chlorhydrate de L-arginine et de chlorhydrate de L-ornithine;

- la figure 3 représente les isoboles de protection contre la mortalité provoquée chez la souris par le chlorure d'ammonium correspondant à des mélanges de chlorhydrate de L-arginine et de L-citrulline;

10 - la figure 5 représente les isoboles de protection contre la mortalité provoquée chez la souris par le chlorure d'ammonium correspondant à des mélanges de L-citrulline et de chlorhydrate de L-ornithine;

- dans la figure 5, le mélange chlorhydrate de L-arginine et chlorhydrate de L-ornithine dans le rapport 3/2 est représenté en ordonnées et la L-citrulline en abscisses;

- la figure 6 représente l'activité du chlorhydrate de L-arginine, du chlorhydrate de L-ornithine et du mélange 3/2 de chlorhydrate de L-arginine et de chlorhydrate de L-ornithine par rapport à l'activité de la L-acétylglutamine.

#### 20 EXEMPLES 1 à 14

On injecte par voie intrapéritonéale à des souris pesant de 18 à 25 g 20 ml/kg de la solution aqueuse préparée selon les compositions figurant dans les tableaux 1 à 14 et après 30 mn, on injecte par voie intrapéritonéale 20 ml/kg d'une solution de chlorure d'ammonium à 4% (poids/volume).

25 On observe les animaux pendant une semaine; la mortalité apparaît en 3 h. Les résultats figurent dans les tableaux suivants qui indiquent les doses, le nombre d'animaux utilisés, la valeur des  $DE_{50}$  et les limites de confiance.

TABLEAU I

30 Action protectrice du chlorhydrate de L-arginine contre l'intoxication aigüe par le chlorure d'ammonium chez la souris.

Dose (millimole/kg)i.p.	Mortalité	%	Logarithme de la dose
0,25	18/20	90,0	- 0,6021
0,50	26/40	65,0	- 0,3010
35 1,00	39/70	55,7	0,0000
2,00	23/50	46,0	0,3010
4,00	4/20	20,0	0,6021

$DE_{50}$  = 1,316 millimole/kg (0,954 - 1,817) correspondant à 277,23 mg/kg (200,97 - 382,77) de L-arginine, HCl.

TABLEAU II

Action protectrice du chlorhydrate de L-ornithine contre l'intoxication aiguë par le chlorure d'ammonium chez la souris.

	<u>Dose (millimole/kg) i.p.</u>	<u>Mortalité</u>	<u>%</u>	<u>Logarithme de la dose</u>
5	0,25	19/20	95,0	- 0,6021
	0,50	41/60	68,3	- 0,3010
	1,00	27/70	38,6	0,0000
	2,00	14/50	28,0	0,3010
	4,00	1/20	5,0	0,6021
10	DE <sub>50</sub> = 0,857 millimole/kg (0,713 - 1,032) correspondant à 144,54 mg/kg (120,23 - 174,02) de L-ornithine, HCl			

TABLEAU III

Action protectrice de la L-citrulline contre l'intoxication aiguë par le chlorure d'ammonium chez la souris.

	<u>Dose (millimole/kg) i.p.</u>	<u>Mortalité</u>	<u>%</u>	<u>Logarithme de la dose</u>
15	0,25	30/40	75,0	- 0,6021
	0,50	41/60	68,3	- 0,3010
	1,00	48/90	53,3	0,0000
	2,00	27/70	38,6	0,3010
20	4,00 *	1/40	2,5	

\* Les résultats correspondant à cette dose n'ont pas été utilisés dans les calculs.

DE<sub>50</sub> = 1,026 millimole/kg (0,817 - 1,949) correspondant à 179,74 mg/kg (143,13 - 341,45) de L-citrulline.

TABLEAU IV

25 Action protectrice d'un mélange (mélange A) de chlorhydrate de L-arginine (81,79% en poids) et de chlorhydrate de L-ornithine (18,21% en poids) contre l'intoxication aiguë par le chlorure d'ammonium chez la souris.

	<u>Dose (millimole/kg) i.p.</u>	<u>Mortalité</u>	<u>%</u>	<u>Logarithme de la dose d'arginine</u>
30	(L-arginine, HCl 0,4746 (L-ornithine, HCl 0,1304	23/40	57,5	- 0,3237
	(L-arginine, HCl 0,5316 (L-ornithine, HCl 0,1482	22/40	55,0	- 0,2744
	(L-arginine, HCl 0,5981 (L-ornithine, HCl 0,1660	29/40	72,5	- 0,2232
35	(L-arginine, HCl 0,6693 (L-ornithine, HCl 0,1838	19/40	47,5	- 0,1743
	(L-arginine, HCl 0,7500 (L-ornithine, HCl 0,2075	13/40	32,5	- 0,1249

TABLEAU IV (suite)

Action protectrice d'un mélange (mélange A) de chlorhydrate de L-arginine (81,79% en poids) et de chlorhydrate de L-ornithine (18,21% en poids) contre l'intoxication aiguë par le chlorure d'ammonium chez la souris.

	Dose (millimole/kg) i.p.	Mortalité	%	Logarithme de la dose d'arginine
5	(L-arginine, HCl 0,8449 (L-ornithine, HCl 0,2372	9/40	22,5	- 0,0732
10	(L-arginine, HCl 0,9493 (L-ornithine, HCl 0,2668	7/40	17,5	- 0,0226
	(L-arginine, HCl 1,0680 (L-ornithine, HCl 0,2965	5/40	12,5	0,0286
15	DE <sub>50</sub> = 0,607 millimole/kg de L-arginine, HCl (0,561 - 0,656) associée à 0,169 millimole/kg de L-ornithine, HCl (0,156 - 0,182) correspondant à 127,87 mg/kg de L-arginine, HCl (118,18 - 138,19 associés à 28,50 mg/kg de L-ornithine, HCl (26,30 - 30,69).			

TABLEAU V

Action protectrice d'un mélange (mélange B) de chlorhydrate de L-arginine (59,90% en poids) et de chlorhydrate de L-ornithine (40,10% en poids) contre l'intoxication aiguë par le chlorure d'ammonium chez la souris.

	Dose (millimole/kg) i.p.	Mortalité	%	Logarithme de la dose d'arginine
20	(L-arginine, HCl 0,1898 (L-ornithine, HCl 0,1601	15/20	75,0	- 0,7216
25	(L-arginine, HCl 0,2990 (L-ornithine, HCl 0,2490	28/40	70,0	- 0,5243
	(L-arginine, HCl 0,3797 (L-ornithine, HCl 0,3202	22/40	55,0	- 0,4206
30	(L-arginine, HCl 0,4746 (L-ornithine, HCl 0,3973	17/40	42,5	- 0,3237
	(L-arginine, HCl 0,5933 (L-ornithine, HCl 0,4981	3/20	15,0	- 0,2267
35	(L-arginine, HCl 0,7500 (L-ornithine, HCl 0,6286	2/20	10,0	- 0,1249
	DE <sub>50</sub> = 0,383 millimole/kg de L-arginine, HCl (0,340 - 0,432) associée à 0,320 millimole/kg de L-ornithine, HCl (0,284 - 0,361) correspondant à 80,68 mg/kg de L-arginine, HCl (71,62 - 91,01) associés à 53,96 mg/kg de L-ornithine, HCl (47,89 - 60,87)			

TABLEAU VI

Action protectrice d'un mélange (mélange C) de chlorhydrate de L-arginine (33,63 % en poids) et de chlorhydrate de L-ornithine (66,37% en poids) contre l'intoxication aiguë par le chlorure d'ammonium chez la souris.

	Dose (millimole/kg) i.p.	Mortalité	%	Logarithme de la dose d'arginine
5	(L-arginine,HCl 0,2990 (L-ornithine,HCl 0,7413	30/40	75,0	-0,5243
10	(L-arginine,HCl 0,3370 (L-ornithine,HCl 0,8302	13/20	65,0	-0,4724
	(L-arginine,HCl 0,3750 (L-ornithine,HCl 0,9310	15/20	75,0	-0,4260
	(L-arginine,HCl 0,4224 (L-ornithine,HCl 1,0437	15/20	75,0	-0,3743
15	(L-arginine,HCl 0,4746 (L-ornithine,HCl 1,1683	25/40	62,5	-0,3237
	(L-arginine,HCl 0,5316 (L-ornithine,HCl 1,3106	21/40	52,5	-0,2744
20	(L-arginine,HCl 0,5981 (L-ornithine,HCl 1,4707	11/40	27,5	-0,2232
	(L-arginine,HCl 0,6693 (L-ornithine,HCl 1,6486	8/40	20,0	-0,1743
	(L-arginine,HCl 0,7500 (L-ornithine,HCl 1,8562 *	3/40	7,5	

25 \* Les résultats correspondant à cette dose n'ont pas été utilisés dans les calculs.

DE<sub>50</sub> = 0,490 millimole/kg de L-arginine,HCl (0,453- 0,529 associée à  
1,208 millimole/kg de L-ornithine,HCl (1,117-1,304) correspondant à  
103,22 mg/kg de L-arginine,HCl (95,43 - 111,44) associés à  
203,69 mg/kg de L-ornithine,HCl (188,35 - 219,88)

TABLEAU VII

30 Action protectrice d'un mélange (mélange A') de chlorhydrate de L-arginine (75% en poids) et de L-citrulline (25% en poids) contre l'intoxication aiguë par le chlorure d'ammonium, chez la souris.

	Dose (millimole/kg) i.p.	Mortalité	%	Logarithme de la dose d'arginine
35	(L-arginine,HCl 0,2990 (L-citrulline 0,1198	33/40	82,5	- 0,5243
	(L-arginine,HCl 0,4746 (L-citrulline 0,1883	30/40	75,0	- 0,3237
	(L-arginine,HCl 0,7500 (L-citrulline 0,3025	21/40	52,5	- 0,1249
	(L-arginine,HCl 1,1914 (L-citrulline 0,4794	15/40	37,5	0,0760



DE<sub>50</sub> = 0,848 millimole/kg de L-arginine, HCl (0,662 - 1,085) associée à  
 0,340 millimole/kg de L-citrulline (0,265 - 0,435) correspondant à  
 178,65 mg/kg de L-arginine, HCl (139,46 - 228,57) associés à  
 59,55 mg/kg de L-citrulline (46,49 - 76,19)

5

TABLEAU VIII

Action protectrice d'un mélange (mélange B') de chlorhydrate de L-arginine (50% en poids) et de L-citrulline (50% en poids) contre l'intoxication aigüe par le chlorure d'ammonium chez la souris.

	Dose (millimole/kg) i.p.	Mortalité	%	Logarithme de la dose d'arginine
10	(L-arginine, HCl 0,2373 L-citrulline 0,2854)	31/40	77,5	- 0,6247
	(L-arginine, HCl 0,3750 L-citrulline 0,4509)	23/40	57,5	- 0,4260
15	(L-arginine, HCl 0,5981 L-citrulline 0,7192)	21/40	52,5	- 0,2232
	(L-arginine, HCl 0,9493 L-citrulline 1,1416)	16/40	40,0	- 0,0226

DE<sub>50</sub> = 0,625 millimole/kg de L-arginine, HCl (0,450 - 0,867) associée à  
 0,751 millimole/kg de L-citrulline (0,541 - 1,042) correspondant à  
 131,66 mg/kg de L-arginine, HCl (94,80 - 182,64) associés à  
 131,66 mg/kg de L-citrulline (94,80 - 182,64)

TABLEAU IX

Action protectrice d'un mélange (mélange C') de chlorhydrate de L-arginine (25% en poids) et de L-citrulline (75% en poids) contre l'intoxication aigüe par le chlorure d'ammonium chez la souris.

25

	Dose (millimole/kg) i.p.	Mortalité	%	Logarithme de la dose d'arginine
30	(L-arginine, HCl 0,1898 L-citrulline 0,6792)	29/40	72,5	- 0,7216
	(L-arginine, HCl 0,2373 L-citrulline 0,8562)	20/40	50,0	- 0,6247
	(L-arginine, HCl 0,2990 L-citrulline 1,0788)	16/40	40,0	- 0,5243
35	(L-arginine, HCl 0,3750 L-citrulline 1,3585)	13/40	32,5	- 0,4260

DE<sub>50</sub> = 0,249 millimole/kg de L-arginine, HCl (0,227 - 0,272) associée à  
 0,898 millimole/kg de L-citrulline (0,819 - 0,981) correspondant à  
 52,45 mg/kg de L-arginine, HCl (47,82 - 57,30) associés à  
 157,35 mg/kg de L-citrulline (143,46 - 171,91)

TABLEAU X

Action protectrice d'un mélange (mélange A") de L-citrulline (75% en poids) et de chlorhydrate de L-ornithine (25% en poids) contre l'intoxication aiguë par le chlorure d'ammonium chez la souris.

5	Dose (millimole/kg) i.p.	Mortalité	%	Logarithme de la dose de citrulline
	(L-citrulline 0,4566 (L-ornithine,HCl 0,1601	33/40	82,5	- 0,3404
	(L-citrulline 0,5708 (L-ornithine,HCl 0,1957	25/40	62,5	- 0,2435
10	(L-citrulline 0,7192 (L-ornithine,HCl 0,2490	25/40	62,5	- 0,1432
	(L-citrulline 0,9018 (L-ornithine,HCl 0,3143	31/60	51,7	- 0,0449
15	(L-citrulline 1,1416 (L-ornithine,HCl 0,3973	10/40	25,0	0,0576
	(L-citrulline 1,4327 (L-ornithine,HCl 0,4922	6/40	15,0	0,1561
20	DE <sub>50</sub> = 0,815 millimole/kg de L-citrulline (0,745 - 0,893) associée à 0,282 millimole/kg de L-ornithine,HCl (0,258 - 0,309) correspondant à 142,78 mg/kg de L-citrulline (130,52 - 156,44) associés à 47,59 mg/kg de L-ornithine, HCl (43,51 - 52,15)			

TABLEAU XI

Action protectrice d'un mélange (mélange B") de L-citrulline (50% en poids) et de chlorhydrate de L-ornithine (50% en poids) contre l'intoxication aiguë par le chlorure d'ammonium chez la souris.

25	Dose (millimole/kg) i.p.	Mortalité	%	Logarithme de la dose de citrulline
	(L-citrulline 0,2854 (L-ornithine,HCl 0,2965	28/40	70,0	-0,5446
	(L-citrulline 0,4566 (L-ornithine,HCl 0,4744	26/40	65,0	-0,3404
30	(L-citrulline 0,5080 (L-ornithine,HCl 0,5278	27/40	67,5	-0,2941
	(L-citrulline 0,5708 (L-ornithine,HCl 0,5930	23/40	57,5	-0,2435
35	(L-citrulline 0,6393 (L-ornithine,HCl 0,6642	16/40	40,0	-0,1943
	(L-citrulline 0,7192 (L-ornithine,HCl 0,7472	8/40	20,0	-0,1432
	(L-citrulline 1,1416 (L-ornithine,HCl 1,1860	5/40	12,5	0,0566

DE<sub>50</sub> = 0,539 millimole/kg de L-citrulline (0,483 - 0,602) associée à  
 0,560 millimole/kg de L-ornithine,HCl (0,502 - 0,625) correspondant à  
 94,43 mg/kg de L-citrulline (84,62 - 105,46) associés à  
 94,43 mg/kg de L-ornithine,HCl (84,62 - 105,46)

5

TABLEAU XII

Action protectrice d'un mélange (mélange C") de L-citrulline (25% en poids)  
et de chlorhydrate de L-ornithine (75% en poids) contre l'intoxication  
 10 aiguë par le chlorure d'ammonium chez la souris.

	Dose (millimole/kg) i.p.	Mortalité	%	Logarithme de la dose de citrulline
15	(L-citrulline 0,1141 (L-ornithine,HCl 0,3558	36/40	90,00	-0,9427
	(L-citrulline 0,1826 (L-ornithine,HCl 0,5693	32/40	80,00	-0,7384
20	(L-citrulline 0,2283 (L-ornithine,HCl 0,7116	19/40	47,50	-0,6415
	(L-citrulline 0,2854 (L-ornithine,HCl 0,8895	32/60	53,33	-0,5446
25	(L-citrulline 0,3596 (L-ornithine,HCl 1,1208	39/60	65,00	-0,4454
	(L-citrulline 0,4509 (L-ornithine,HCl 1,4114	31/80	38,75	-0,3459
30	(L-citrulline 0,5708 (L-ornithine,HCl 1,7791	5/40	12,50	-0,2435

DE<sub>50</sub> = 0,330 millimole/kg de L-citrulline (0,296 - 0,369) associée à  
 1,028 millimole/kg de L-ornithine,HCl (0,922 - 1,149) correspondant à  
 35 57,81 mg/kg de L-citrulline (51,86 - 64,65) associés à  
 173,43 mg/kg de L-ornithine,HCl (155,58 - 193,95)

TABLEAU XIII

Action protectrice du mélange dans le rapport 3/2 de chlorhydrate de  
L-arginine et de chlorhydrate de L-ornithine associé avec de la L-citrulline  
 5 à doses croissantes contre l'intoxication aiguë par le chlorure d'ammonium  
chez la souris.

		<u>Composition</u>		<u>Mortalité</u>	<u>DE</u> <u>trouvée</u>	<u>DE</u> <u>théorique</u>
		<u>mg/kg</u>	<u>%</u>			
10						
	L-arginine,HCl	100,00	52,10			
(a)	L-ornithine,HCl	66,95	34,88	25/40	37,5	50
	L-citrulline	25,00	13,02			
		191,95				
15						
	L-arginine,HCl	100,00	46,09			
(b)	L-ornithine,HCl	66,95	30,86	30/40	25	50
	L-citrulline	50,00	23,05			
		216,95				
20						
	L-arginine,HCl	100,00	37,46			
(c)	L-ornithine,HCl	66,95	25,08	31/40	22,5	50
	L-citrulline	100,00	37,46			
		266,95				
25						
	L-arginine,HCl	100,00	27,25			
(d)	L-ornithine,HCl	66,95	18,25	22/40	45	50
	L-citrulline	200,00	54,50			
		366,95				
30						
	L-arginine,HCl	100,00	17,64			
(e)	L-ornithine,HCl	66,95	11,81	31/40	22,5	50
	L-citrulline	400,00	70,55			
		566,95				
35						
	L-arginine,HCl	100,00	10,34			
(f)	L-ornithine,HCl	66,95	6,92	29/40	27,5	50
	L-citrulline	800,00	82,74			
		966,95				

TABLEAU XIV

Action protectrice d'un mélange de 50 % de chlorhydrate de L-arginine, 25% de chlorhydrate de L-ornithine et 25% de L-citrulline contre l'intoxication aiguë par le chlorure d'ammonium chez la souris.

	Dose (mg/kg)	Mortalité	%	Logarithme de la dose d'arginine.
5	(L-Arginine,HCl 79,4			
	(L-ornithine,HCl 39,7	36/50	72	1,90
	(L-citrulline 39,7			
10	(L-arginine,HCl 100,0			
	(L-ornithine,HCl 50,0	30/50	60	2,00
	(L-citrulline 50,0			
	(L-arginine,HCl 112,2			
	(L-ornithine,HCl 56,1	31/50	62	2,05
	(L-citrulline 56,1			
15	(L-arginine,HCl 125,9			
	(L-ornithine,HCl 63,0	18/50	36	2,10
	(L-citrulline 63,0			
	(L-arginine,HCl 141,3			
	(L-ornithine,HCl 70,6	12/50	24	2,15
	(L-citrulline 70,6			
20	DE <sub>50</sub> = 110,80 mg/kg de L-arginine,HCl (104,00 -118,10) associés à 55,40 mg/kg de L-ornithine,HCl (52,00- 59,05) 55,40 mg/kg de L-citrulline (52,00 - 59,05)			
	Total 221,60 mg/kg	(208,00 - 236,20)		

25

Pour montrer de façon plus détaillée l'activité de chaque composant dans les mélanges des tableaux, les résultats sont illustrés dans les figures 1 à 5 des dessins sous la forme graphique proposée par Loewe, *Arzneim. Forsch.* 3 285 (1953); Loewe, *Pharmacol. Rev.* 9 237 (1957) et Loewe, *Arzneim. Forsch.* 9 449 (1959). Les doses en mg/kg de l'un des composants sont représentées en ordonnées et celles de l'autre composant en abscisses. Sur les coordonnées figurent les doses de chaque composant séparé ayant un effet quantitativement ou qualitativement similaire, c'est-à-dire la DE<sub>50</sub>.

35

La figure 1 représente les courbes obtenues appelées "isoboles" par Loewe. Si l'effet est dû aux activités communes des deux composants, comme c'est par exemple le cas de la toxicité, les lignes peuvent :

1. ne pas s'influencer mutuellement (lignes a et b);
2. s'additionner (ligne c);
3. se renforcer (courbe d);
4. être antagonistes (courbes e et f).

5 L'antagonisme peut être absolu lorsque les isoboles se dirigent en dessous de l'angle droit formé par les deux doses d'action égale des deux composants non mélangés (courbe f) ou relatif lorsque l'isobole est convexe mais reste à l'intérieur de l'angle droit (courbe e).

10 La figure 2 montre que les mélanges de chlorhydrate de L-arginine et de chlorhydrate de L-ornithine présentent tout d'abord un synergisme de renforcement jusqu'à un certain rapport déterminé, puis un antagonisme absolu.

15 La figure 3 montre que les mélanges de chlorhydrate de L-arginine et de L-citrulline se comportent de même avec tout d'abord une addition des effets puis un antagonisme relatif.

La figure 4 montre que les mélanges de L-citrulline et de chlorhydrate de L-ornithine ne présentent d'abord qu'un antagonisme relatif puis un antagonisme absolu.

20 Dans ces figures, les rayons partant de l'origine des coordonnées correspondent aux divers mélanges A, B, C, A', B', C', A'', B'', C''.

Ces résultats montrent que lorsqu'on étudie les mélanges de deux composants, le mélange de chlorhydrate de L-arginine et de chlorhydrate de L-ornithine donne les meilleurs résultats lorsqu'on mélange ces composants dans un rapport de 3/2 comme c'est le cas du mélange de 80,68 mg/kg de  
25 chlorhydrate de L-arginine et de 53,96 mg/kg de chlorhydrate de L-ornithine; voir tableau V et figure 2.

On n'a pas modifié ce rapport et dans les expériences ultérieures on a considéré le mélange 3/2 de chlorhydrate de L-arginine et de chlorhydrate de L-ornithine comme une substance unique à laquelle on a ajouté la L-citru-  
30 line. Les résultats obtenus montrent que l'addition de L-citrulline diminue l'action protectrice; voir tableau XIII et figure 5. Dans la figure 5, les rayons partant de l'origine des coordonnées correspondent aux divers mélanges dont la composition figure dans le tableau 13.

L'arc de cercle raccordant l'axe des ordonnées (100% de mélange 3/2  
35 chlorhydrate de L-arginine et de chlorhydrate de L-ornithine) à l'axe des abscisses (100% de L-citrulline) correspond à la  $DE_{50}$  théorique calculée à partir de la somme des effets, tandis que la courbe située au-dessus correspond à la  $DE$  trouvée. Chaque rayon coupant la courbe de la  $DE_{50}$  est divisé en parties proportionnelles; la  $DE_{100}$  est située à l'origine des coordonnées

et la  $DE_0$  à une distance du point d'intersection égale à la distance entre l'origine des coordonnées et le point d'intersection.

La  $DE_{50}$  du mélange 3/2 de chlorhydrate de L-arginine et de chlorhydrate de L-ornithine de l'invention correspond à 134,64 mg/kg d'acides totaux, ce qui est inférieur de 39,24% à la somme de chacun des

#### EXEMPLE 15

Pour illustrer l'action protectrice du mélange de l'invention dans le traitement du surmenage intellectuel, on injecte, à des souris pesant de 18 à 25 g, 20 ml/kg d'une solution aqueuse aux doses indiquées dans le tableau XV et après 30 mn, une seule injection intraventriculaire de 0,03 ml de chlorure d'ammonium à 4% (poids/volume). On observe les animaux pendant une semaine; la mortalité se produit en 3 h.

Le tableau 15 montre que le traitement préalable par le chlorhydrate de L-arginine ou le chlorhydrate de L-ornithine a un faible pouvoir protecteur bien qu'il soit statistiquement significatif, déterminé à partir de la mortalité provoquée par l'injection intracérébrale de chlorure d'ammonium (détermination de  $\chi^2$  avec correction de Yates). Le mélange 3/2 de chlorhydrate de L-arginine et de chlorhydrate de L-ornithine a une action protectrice nettement supérieure, à des doses inférieures, à celles de chacun des aminoacides.

TABLEAU XV

Action protectrice du chlorhydrate de L-arginine, du chlorhydrate de L-ornithine et d'un mélange dans un rapport de 3/2 de ces composés dans l'intoxication aiguë provoquée par injection intracérébrale de chlorure d'ammonium à la souris.

	Substance	Dose (mg/kg)	Mortalité	Action protectrice (%)	$\chi^2$	P
30	Solution physiologique	10 ml/kg i.p.	50/50	0,00	--	--
	L-arginine, HCl	400 mg/kg i.p.	32/40	20,00	8,645	( 0,001 0,005
	L-arginine, HCl	800 mg/kg i.p.	31/40	22,50	10,125	( 0,001 0,005
	L-ornithine, HCl	400 mg/kg i.p.	31/40	22,50	10,125	( 0,001 0,005
35	L-ornithine, HCl	800 mg/kg i.p.	33/40	17,50	7,205	( 0,005 0,010
	L-arginine, HCl + L-ornithine, HCl	( 400 mg/kg i.p. ( +267 mg/kg i.p.	23/40	42,50	23,498	0,005

EXEMPLE 16

On étudie le pouvoir protecteur du chlorhydrate de L-arginine, du chlorhydrate de L-ornithine et du mélange 3/2 de chlorhydrate de L-arginine et de chlorhydrate de L-ornithine contre l'intoxication aiguë provoquée chez la souris par l'injection intracérébrale de chlorure d'ammonium (0,03 ml/souris de chlorure d'ammonium à 4%), par rapport à la L-acétylglutamine. On administre ces substances par voie intrapéritonéale à des souris des deux sexes pesant de 18 à 25 g, 1 h avant injection intraventriculaire de chlorure d'ammonium à 4% comme indiqué dans le tableau XVI.

10

TABLEAU XVI

		Mortalité provoquée après 1 heure par l'injection intracérébrale de chlorure d'ammonium.	
	Substance protectrice	Dose (mg/kg)	Total des morts
			Mortalité %
15	L-acétylglutamine	100	38/40
		200	34/40
		400	33/40
		800	31/40
		1600	28/40
20	L-arginine, HCl	100	36/40
		200	34/40
		400	32/40
		800	31/40
		1600	27/40
25	L-ornithine, HCl	100	35/40
		200	34/40
		400	31/40
		800	33/40
		1600	29/40
30	L-arginine, HCl +	167	31/40
		334	28/40
	L-ornithine, HCl	668	23/40
		1356	25/40
	dans le rapport de 3/2		

(les doses correspondent à la somme des deux aminoacides).

Si l'on attribue à la L-acétylglutamine une activité égale à 1,000 (standard), les autres substances ont les activités suivantes :



TABLEAU XVII

	Substance	Activité	Limites de confiance (P = 0,05)
5	L-acétylglutamine	1,000	
	L-arginine,HCl	1,337	(0,441 -4,046)
	L-ornithine,HCl	1,094	(0,350 -3,322)
	L-arginine,HCl + 3/2	5,676	(1,195 -26,970)
	L-ornithine,HCl		

10

La figure 6 illustre les résultats ci-dessus.

Le chlorhydrate de L-arginine et le chlorhydrate de L-ornithine ont une bonne activité protectrice contre l'intoxication par l'ammoniaque réalisée par voie intracérébrale chez la souris. Cependant leur efficacité est pratiquement semblable à celle de la L-acétylglutamine utilisée comme substance standard.

Au contraire, le mélange 3/2 de chlorhydrate de L-arginine et de chlorhydrate de L-ornithine est bien plus actif que la substance standard et son taux d'activité est très significatif car la limite inférieure de confiance est supérieure à l'unité.

Bien entendu diverses modifications peuvent être apportées par l'homme de l'art aux dispositifs ou procédés qui viennent d'être décrits uniquement à titre d'exemples non limitatifs sans sortir du cadre de l'invention.

RE V E N D I C A T I O N S

- 1 - Mélange d'acides aminés caractérisé en ce qu'il est constitué de trois parties en poids de L-arginine ou d'un de ses sels convenant en pharmacie et de deux parties en poids de L-ornithine ou d'un de ses sels pharmaceutiquement acceptable.
- 2 - Mélange d'acides aminés selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il contient 0,607 mole de L-arginine ou d'un de ses sels convenant en pharmacie et 0,169 mole de L-ornithine ou d'un de ses sels pharmaceutiquement acceptable.
- 3 - Nouveaux médicaments utiles notamment pour le traitement des affections hépatiques et du surmenage intellectuel, caractérisés en ce qu'ils consistent en un mélange selon l'une des revendications 1 ou 2.
- 4 - Compositions thérapeutiques caractérisées en ce qu'elles contiennent comme ingrédient actif un médicament selon la revendication 3, associé à un support convenant en pharmacie.
- 5 - Composition thérapeutique selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle contient une ou plusieurs substances thérapeutiques additionnelles.
- 6 - Composition thérapeutique selon la revendication 5, caractérisée en ce que les substances thérapeutiques additionnelles sont choisies parmi la méthionine, l'acide lipofique, la cocarboxylase, la coenzyme B<sub>12</sub>, la coenzyme A, l'extrait de foie et l'oxybétaine.
- 7 - Composition selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle est dissoute dans l'extrait de foie.
- 8 - Composition selon l'une quelconque des revendications 4 à 7, caractérisée en ce que la L-arginine et la L-ornithine sont sous forme de leur chlorhydrate.
- 9 - Préparation pharmaceutique pour l'administration par voie orale, caractérisée en ce qu'elle est constituée d'une composition selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, la dose journalière d'administration de l'ingrédient actif étant comprise entre 7 mg et 70 mg/kg de poids corporel.
- 10 - Préparation pharmaceutique pour l'administration par voie intraveineuse, caractérisée en ce qu'elle est constituée d'une composition selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, la dose journalière d'administration de l'ingrédient actif étant comprise entre 7 mg et 70 mg/kg de poids corporel.
- 11 - Préparation pharmaceutique pour l'administration par voie intramusculaire caractérisée en ce qu'elle est constituée d'une composition selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, la dose journalière d'administration de l'ingrédient actif étant comprise entre 7 mg et 70 mg/kg de poids corporel.

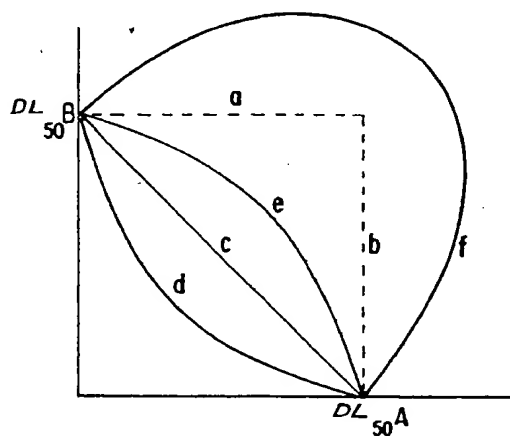


FIG. 1

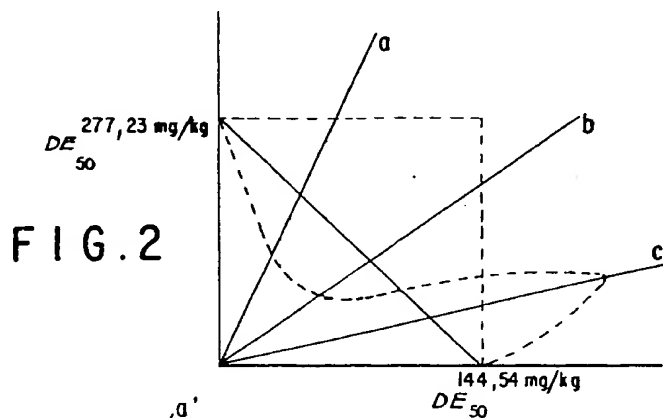


FIG. 2

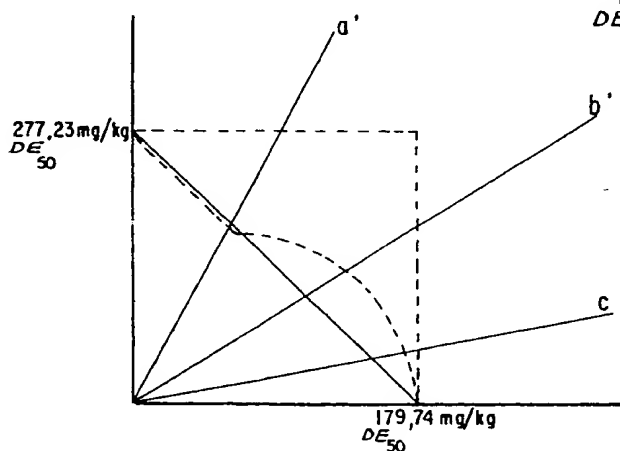


FIG. 3

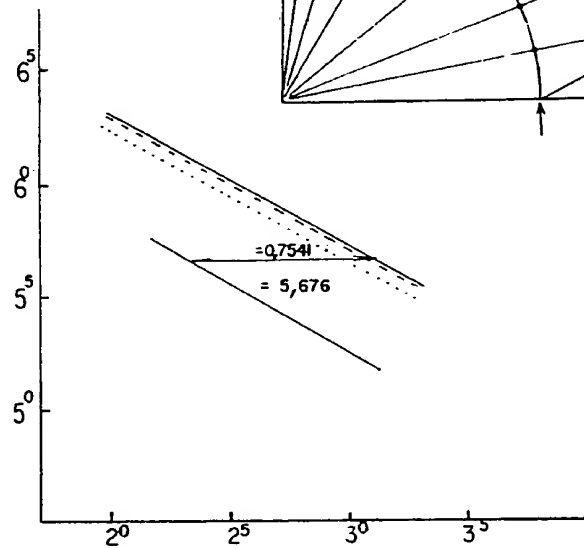
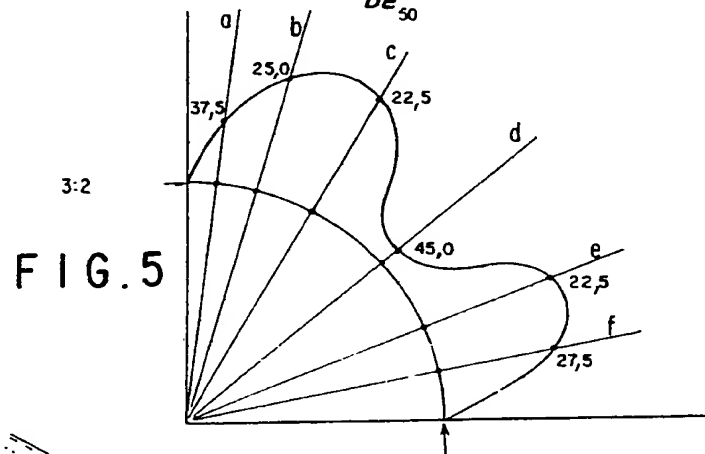
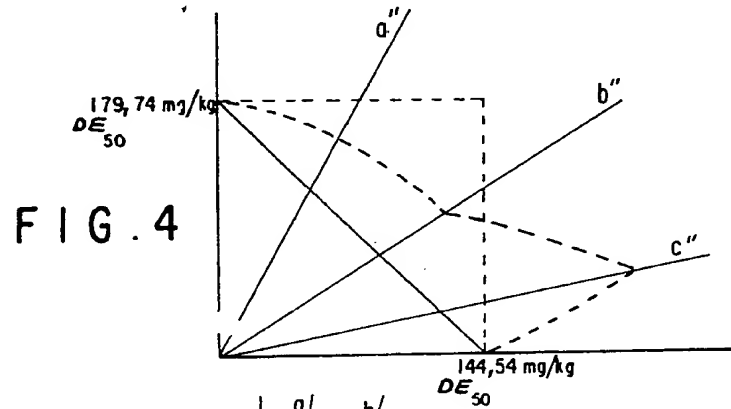


FIG. 6